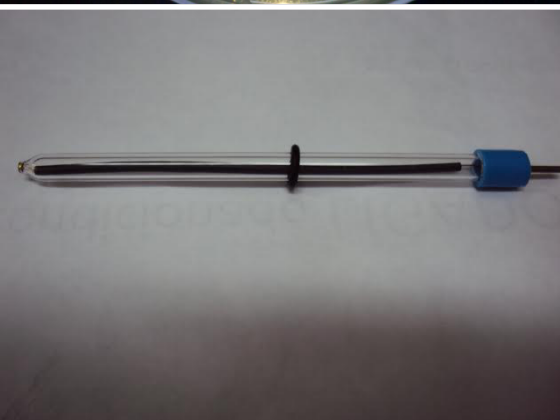
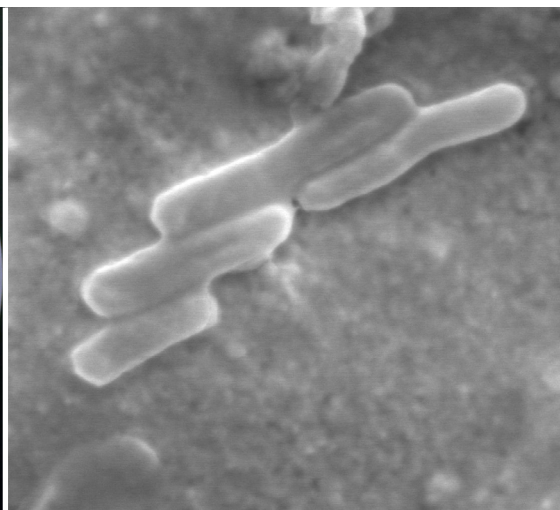
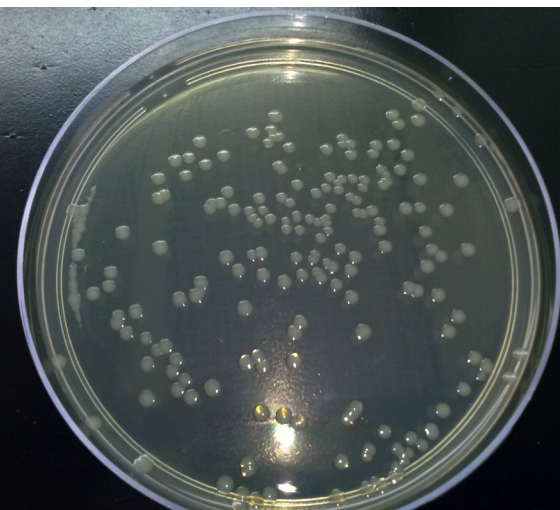


Etapas de Montagem e Funcionamento de um Imunossensor Amperométrico para Detecção de *Salmonella*



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Agroindústria Tropical
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 110

Etapas de Montagem e Funcionamento de um Imunossensor Amperométrico para Detecção de *Salmonella*

Aíris Maria Araújo Melo

Dalila Lima Alexandre

Roselayne Ferro Furtado

Maria de Fátima Borges

Carlúcio Roberto Alves

Evânia Altina Teixeira de Figueiredo

Embrapa Agroindústria Tropical
Fortaleza, CE
2016

Unidade responsável pelo conteúdo e edição:

Embrapa Agroindústria Tropical
Rua Dra. Sara Mesquita 2270, Pici
CEP 60511-110 Fortaleza, CE
Fone: (85) 3391-7100
Fax: (85) 3391-7109
www.embrapa.br/agroindustria-tropical
www.embrapa.br/fale-conosco

Comitê de Publicações da Embrapa Agroindústria Tropical

Presidente: *Gustavo Adolfo Saavedra Pinto*

Secretária-executiva: *Celli Rodrigues Muniz*

Membros: *Janice Ribeiro Lima, Marlos Alves Bezerra, Luiz Augusto
Lopes Serrano, Marlon Vagner Valentim Martins,
Guilherme Julião Zocolo, Rita de Cássia Costa Cid,
Eliana Sousa Ximendes*

Supervisão editorial: *Marcos Antônio Nakayama*

Revisão de texto: *Marcos Antônio Nakayama*

Normalização: *Rita de Cássia Costa Cid*

Foto da capa: *Aíris Maria Araújo Melo*

Editoração eletrônica: *Arilo Nobre de Oliveira*

1ª edição

On-line (2016)

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Agroindústria Tropical

Etapas de montagem e funcionamento de um imunossensor amperométrico para detecção de *Salmonella* / Aíris Maria Araújo Melo... [et al.]. – Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2016.

21 p. ; 14,8 cm x 21 cm. – (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Agroindústria Tropical, ISSN 1679-6543; 110).

Publicação disponibilizada on-line no formato PDF.

1. Biossensor. 2. Metodologia. 3. Enterobactéria. 4. Segurança de alimentos. 5. Monitoramento. I. Melo, Aíris Maria Araújo. II. Alexandre, Dalila Lima. III. Furtado, Roselayne Ferro. IV. Borges, Maria de Fátima. V. Alves, Carlúcio Roberto. VI. Figueiredo, Evânia Altina Teixeira de. VII. Série.

CDD 579.344

© Embrapa 2016

Sumário

Resumo	4
Abstract.....	6
Introdução.....	7
Material e Métodos.....	9
Resultados e Discussão.....	14
Conclusão	18
Agradecimentos	18
Referências	19

Etapas de Montagem e Funcionamento de um Imunossensor Amperométrico para Detecção de *Salmonella*

Aíris Maria Araújo Melo¹

Dalila Lima Alexandre²

Roselayne Ferro Furtado³

Maria de Fátima Borges⁴

Carlúcio Roberto Alves⁵

Evânia Altina Teixeira de Figueiredo⁶

Resumo

Bactérias do gênero *Salmonella* têm sido relatadas como os principais agentes etiológicos de doenças transmitidas por alimentos. O desenvolvimento de biossensores capazes de detectar *Salmonella* sp. pode ser uma ferramenta de grande importância no controle da segurança de alimentos, impedindo a comercialização de alimentos que representem riscos à saúde humana. No presente trabalho, um imunossensor amperométrico foi desenvolvido para a detecção de *Salmonella* sp. A resposta amperométrica do imunossensor foi obtida após estudos de otimização, e o desempenho foi avaliado em diferentes concentrações de *Salmonella*. A curva de resposta do imunossensor apresentou um perfil qualitativo frente às diferentes concentrações de *Salmonella*. As respostas

¹ Bióloga, mestranda em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, airismelo@oi.com.br

² Estudante de química da Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, dalilalimalaalexandre@hotmail.com

³ Bióloga, doutora em Biotecnologia, pesquisadora da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, roselayne.furtado@embrapa.br

⁴ Farmacêutica, doutora em Tecnologia de Alimentos, pesquisadora da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, maria.fatima@embrapa.br

⁵ Químico, doutor em Físico-química, professor da Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, alvescr@yahoo.com

⁶ Bióloga, doutora em Microbiologia, professora da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, evania@ufc.br

foram avaliadas estatisticamente ($p \leq 0,05$) e apresentaram diferenças significativas entre o controle (solução tampão) e as concentrações de *Salmonella* testadas (10^1 a 10^6 UFC mL⁻¹). O imunossensor apresentou um limite de detecção (LD) de 10 UFC mL⁻¹, demonstrando ser mais eficiente que a maioria dos métodos rápidos comercialmente disponíveis para detecção de *Salmonella*. Esses resultados comprovam a eficiência dos procedimentos de montagem, otimização e obtenção da resposta analítica adotados no desenvolvimento do imunossensor amperométrico para a detecção de *Salmonella* sp.

Termos para indexação: biossensor, metodologia, enterobactéria, segurança de alimentos.

Assembly and Performance of an Amperometric Immunosensor for Detection of *Salmonella*

Abstract

Salmonella bacteria have been reported as the main cause of foodborne diseases worldwide. The development of biosensors capable of detecting the presence of *Salmonella* sp. can be a very important tool of food safety control, preventing the release of food that represent a risk to human health. In the present work, an amperometric immunosensor to detect *Salmonella* sp. was developed from optimization studies in different assembly and operation steps. The amperometric immunosensor response was tested at different *Salmonella* concentrations for the construction of the response curve and evaluation of device performance. The immunosensor response curve showed a qualitative behavior in the amperometric response against *Salmonella*. The results were evaluated statistically ($p \leq 0.05$) and were found significant differences between the control (buffer solution) and *Salmonella* concentrations (10^1 to 10^6 CFU mL⁻¹). The immunosensor showed a detection limit of 10 CFU mL⁻¹, demonstrating to be more efficient than most commercially available rapid methods for *Salmonella* detection. These results indicate the efficiency of assembly, optimization procedures and obtainment of the analytical response adopted in this study for the detection of *Salmonella* sp.

Index terms: biosensor, methods, enterobacteria, food safety.

Introdução

A segurança de alimentos é uma preocupação crescente das indústrias e dos consumidores, devido ao constante e elevado número de surtos envolvendo microrganismos patogênicos. O gênero *Salmonella*, segundo autoridades de saúde no Brasil e nos Estados Unidos, é o agente etiológico mais associado aos surtos de intoxicação alimentar. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), no período de 2000 a 2014, registrou 1.564 surtos associados aos alimentos contaminados por *Salmonella* sp. (ANVISA, 2014), enquanto os Centers of Diseases Control and Prevention (CDC) nos EUA, no período de 1998 a 2008, registraram 1.449 surtos (CENTERS OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2013).

A legislação brasileira (ANVISA, 2001) estabelece os padrões microbiológicos para alimentos e determina que o alimento apropriado para consumo humano deve apresentar ausência de *Salmonella* sp. em 25 g da amostra. Esse padrão não se aplica às aves e seus derivados, por serem hospedeiros naturais de *Salmonella*, devendo o controle ser garantido nas etapas de processamento e de preparo do alimento. Os métodos convencionais para detecção de *Salmonella* são considerados demorados, necessitando de, no mínimo, cinco dias para a confirmação do resultado (ANDREWS et al., 2014). Por outro lado, os métodos com base nos ensaios imunológicos e na reação em cadeia da polimerase, *polymerase chain reaction* (PCR), são mais rápidos, porém ainda não estão difundidos no controle de qualidade de alimentos em virtude do seu alto custo e necessidade de estrutura laboratorial específica e onerosa, além de alto investimento na capacitação de profissionais para a execução das atividades laboratoriais e operação de equipamentos.

As indústrias de alimentos precisam adequar-se aos regulamentos estabelecidos pelas autoridades sanitárias, aos requisitos do mercado externo e ao aumento do nível de exigência do mercado interno, mantendo a sua competitividade. Nesse cenário, tornou-se uma questão estratégica buscar metodologias analíticas rápidas, confiáveis, práticas e de custo acessível.

Os biossensores são dispositivos bioeletrônicos capazes de detectar rapidamente analitos (espécies químicas e/ou biológicas) tanto quantitativa como qualitativamente (FURTADO et al., 2008). Esses dispositivos são formados por dois componentes principais, um biorreceptor e um transdutor, sendo o último capaz de converter a resposta bioquímica em um sinal elétrico. Entre os diferentes tipos de transdutores, os mais utilizados são: ópticos, piezoelétricos e eletroquímicos. Os biossensores com transdutores eletroquímicos têm sido relatados com frequência na detecção de microrganismos envolvidos em surtos de intoxicação alimentar (ARORA et al., 2013), sendo amplamente usados em diferentes áreas e considerados uma alternativa de resposta rápida para a detecção de bactérias patogênicas (VELUSAMY et al., 2010).

O desempenho de um imunossensor também está relacionado ao procedimento de imobilização de biomoléculas. Com o objetivo de intensificar a resposta de imunossensores, a maioria dos protocolos inclui estudos de otimização que envolvem testes com diferentes métodos de imobilização e concentrações das biomoléculas (BABACAN et al., 2000; MANTZILA et al., 2008). A imobilização de anticorpos de forma orientada tem apresentado resultados promissores, melhorando a especificidade e sensibilidade da detecção de bactérias, em comparação com imunossensores sem orientação das imunoglobulinas (MAKARAVICIUTE; RAMANAVICIENE, 2013). Esse comportamento provavelmente ocorre devido à afinidade natural da proteína A pela região Fc (Fração constante), impedindo o bloqueio dos locais ativos (região Fab) para a ligação ao antígeno. Babacan et al. (2000) testaram diferentes métodos de imobilização de anticorpos no desenvolvimento de um imunossensor e verificaram que a imobilização orientada de anticorpos com proteína A apresentou resultados mais estáveis e reprodutíveis.

Neste trabalho, foi desenvolvido um imunossensor amperométrico para detecção de *Salmonella* sp. a partir de eletrodos de ouro.

Material e Métodos

A superfície dos detectores foi modificada empregando a técnica de monocamada automontada, usando tiol, proteína A, albumina bovina (BSA), anticorpo primário anti-*Salmonella* e anticorpo secundário anti-*Salmonella* marcado com a enzima peroxidase. A resposta analítica do imunossensor foi avaliada em tampão fosfato com diferentes concentrações da bactéria (Figura 1).

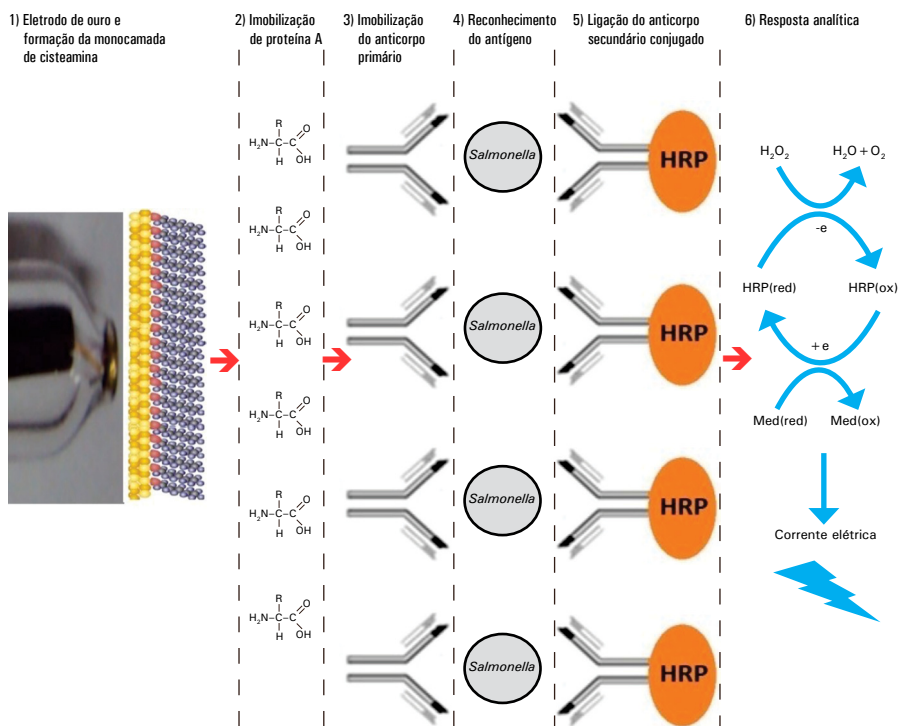


Figura 1. Esquema da estrutura do biossensor, apresentando as etapas de montagem e a resposta analítica.

A resposta analítica do imunossensor apresentado neste trabalho foi obtida pela técnica de cronoamperometria a partir da degradação de H_2O_2 . A reação foi catalisada pela enzima Horseradish peroxidase (HRP) e mediada por hidroquinona (HQ). A resposta mediada tem sido adotada, preferencialmente, no desenvolvimento de imunossensores. Dentre os mediadores, a HQ tem se destacado no desenvolvimento de dispositivos que utilizam anticorpos marcados com a enzima HRP. Uma das razões que justificam sua aplicação é a sua redução em baixo potencial elétrico, característica que diminui os riscos de inativação das biomoléculas presentes na estrutura do imunossensor, além de reduzir as chances de interferência com outras moléculas presentes na amostra. A resposta analítica ocorre em função da doação de elétrons da HQ para a enzima HRP, oxidada pela catálise do peróxido de hidrogênio. Em seguida, moléculas de HQ difundem-se para a superfície do eletrodo de ouro, onde sofrem rápida transferência eletrônica (redução) (ROSATTO et al., 2001).

Microrganismos

O estudo foi realizado com a cepa de referência de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium ATCC® 51812, adquirida da Microbiologics® (Saint Cloud, MN, USA). A cepa liofilizada foi ativada em caldo infusão de cérebro e coração (Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA) a 35 °C por 24 ± 2 h e repicada em ágar infusão de cérebro e coração a 35 °C por 24 ± 2 h, para a obtenção de colônias isoladas. A cultura estoque foi mantida em ágar infusão de cérebro e coração inclinado, armazenada sob refrigeração (4 °C), e em caldo infusão de cérebro e coração adicionado de 25% de glicerol (80% v/v) conservado a uma temperatura de -80 °C. As culturas para avaliação da performance do imunossensor foram preparadas a partir do crescimento de cinco colônias da cepa de referência em 10 mL de caldo nutriente (Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA) a 35 °C por 24 ± 2 h, seguida de centrifugação em rotação de 3.000 rpm por 30 min à temperatura ambiente. A massa de células foi lavada três vezes e suspensa em 10 mL de tampão fosfato (PBS pH 7,4). Em seguida, as diluições foram preparadas no mesmo tampão. A contagem em placas foi realizada em ágar nutriente (Becton, Dickinson

and Company, Sparks, USA) a 35 °C por 24 ± 2 h, e o resultado foi expresso em unidades formadoras de colônias por mL (UFC mL⁻¹).

Soros anti-*Salmonella*

Para obtenção dos anticorpos, foram utilizados soros polivalentes anti-*Salmonella* O Poli A-I e Vi adquiridos da Difco™. Os anticorpos foram purificados por precipitação com (NH₄)₂SO₄ com 45% de saturação (GREEN; HUGHS, 1955). A solução obtida foi mantida sob agitação durante 30 min, seguida de repouso por 24 horas para, posteriormente, ser centrifugada a uma rotação de 10.000 rpm por 15 min à temperatura de 4 °C. O precipitado foi coletado e dialisado contra água deionizada por 24 horas. Após a diálise, o anticorpo foi liofilizado e sua concentração foi determinada pelo método de Bradford (1976). Para esse ensaio, o anticorpo liofilizado foi pesado e diluído em 1 mL de tampão fosfato. Uma solução padrão na concentração de 1 mg mL⁻¹ de BSA foi preparada para a obtenção de diluições e elaboração da curva de calibração em espectrofotômetro utilizando comprimento de onda de 595 nm. A partir da equação da curva da solução padrão, foi obtida a concentração final do anticorpo. Para verificar se a integridade do anticorpo foi mantida no processo de purificação, este foi avaliado por ensaio de aglutinação em lâmina, conforme método do fabricante. Uma gota do anticorpo purificado foi adicionada a uma gota de suspensão bacteriana de *Salmonella* Typhimurium sobre uma lâmina e observação após 2 minutos.

Para a obtenção do anticorpo secundário, o anticorpo primário foi conjugado com a enzima peroxidase de raiz forte Horseradish (HRP) (Sigma-Aldrich®, Saint Louis, MO, EUA) conforme metodologia de Avrameas (1969). A conjugação foi realizada pela dissolução da enzima peroxidase em solução do anticorpo primário com concentração conhecida e adição de 2 µL de glutaraldeído 25%. A massa da enzima peroxidase foi três vezes a concentração do anticorpo primário. A solução foi mantida em repouso durante 2 horas e, em seguida, o anticorpo secundário conjugado foi dialisado contra água deionizada por 24 horas.

Montagem do imunossensor

Pré-tratamento do eletrodo

Eletrodos de ouro ($n = 3$), com área média de $0,020 \text{ cm}^2$, foram polidos com alumina ($0,3 \text{ }\mu\text{m}$) durante 5 min. Seguidamente, a superfície foi colocada dentro de solução de etanol 96% em banho ultrassônico durante 10 min. Ao final, os eletrodos foram testados por meio da técnica de voltametria cíclica em solução de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 4 mM e KCl 1M com janela de potencial de -0,30 V a 0,75 V e velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} , no intuito de verificar a eficiência do procedimento de pré-tratamento. A eficiência da limpeza da superfície pode ser comprovada rapidamente observando: a) a separação dos picos catódicos e anódicos da superfície de ouro em solução de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 4 mM e KCl 1 M (essa diferença deve ser aproximadamente de $57/n \text{ (mV)}$, em que $n = n^\circ$ de elétrons) e b) a relação de correntes (i_{pa}/i_{pc}) igual a 1.

Procedimento de imobilização

A superfície de ouro foi modificada empregando a técnica de monocamadas automontadas (SAMs). Após o pré-tratamento, os eletrodos foram imersos em solução etanólica de cisteamina (cis) 10 mM durante 3 horas, lavados com água destilada e secos à temperatura ambiente.

A proteína A (protA) de *Staphylococcus aureus* foi imobilizada sobre a monocamada de cisteamina. Inicialmente, para ativação dos grupos carboxílicos da protA, esta foi adicionada à solução de N-hidroxissuccinimida/N-(3-dimetilaminopropil) - N'-etilcarbodiimida - (EDC/NHS) (2 mM/5 mM), durante 1 hora (PIMENTA-MARTINS et al., 2012). Em seguida, o eletrodo modificado com cis foi imerso em solução de protA ativada durante 1 hora. Após cada etapa de imersão, o eletrodo foi lavado com solução tampão fosfato 10 mM (pH 7,4).

O eletrodo modificado cis-protA foi imerso *overnight* em solução de anticorpo primário anti-*Salmonella* (Ac). Em seguida, as ligações inespecíficas do eletrodo cist-protA-Ac foram bloqueadas com solução

de albumina de soro bovino 1% durante uma hora. No próximo passo, o imunossensor foi imerso em 100 μL de cultura de *Salmonella* Typhimurium contendo 10^8 UFC mL^{-1} durante 1 hora e, em seguida, em solução de anticorpo conjugado com a enzima peroxidase HRP por 1 hora.

Para definir a melhor concentração de protA e Ac no desempenho do imunossensor, foram conduzidos ensaios variando as concentrações de proteína A em 5,0 mg mL^{-1} ; 7,5 mg mL^{-1} e 10 mg mL^{-1} e de anticorpo primário em 50 mg mL^{-1} ; 75 mg mL^{-1} e 100 mg mL^{-1} . A resposta analítica do imunossensor para as diferentes concentrações foi obtida por voltametria cíclica com velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} , tempo de equilíbrio de 5 s em janela de potencial de -0,4 V a 0,4 V e solução tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 7,4) na presença de peróxido de hidrogênio e hidroquinona.

Avaliação da resposta analítica

A resposta analítica do imunossensor para as diferentes concentrações da bactéria foi avaliada por meio de métodos voltamétricos utilizando sistema eletroquímico de três eletrodos, com eletrodo Ag/AgCl como referência, eletrodo helicoidal de platina como auxiliar e eletrodo de ouro como trabalho ($\varnothing_{\text{int}} = 0,020 \text{ cm}^2$). Foi utilizado um potenciostato/galvanostato (Autolab/PGSTAT12) com o software GPES (v.4.9.007). Os estudos de cronoamperometria foram realizados após a adição de peróxido de hidrogênio e hidroquinona a potencial constante por um tempo 120 s até que uma linha de base fosse estabelecida. Foram otimizados os parâmetros de resposta do sensor em relação à concentração do substrato da enzima e do mediador utilizando o delineamento de composto central rotacional (DCCR). O efeito dessa interação foi estudado por meio de um planejamento DCCR 2^2 , contendo três pontos centrais e quatro pontos axiais, totalizando 11 ensaios.

Para elaboração da curva de calibração, a resposta analítica do imunossensor foi obtida por meio da exposição às diluições seriadas de *Salmonella* Typhimurium nas concentrações de 0 a 10^6 UFC mL^{-1}

em solução tampão fosfato. A resposta analítica nas diferentes concentrações da *Salmonella* foi avaliada para a verificação da diferença significativa aplicando $p \leq 0,05$ e utilizando o programa STATISTICA versão 8.0 da Statsoft.

Resultados e Discussão

Montagem do imunossensor

Otimização das concentrações de proteína A e anticorpo

Na análise dos voltamogramas apresentados na Figura 2a, observou-se que, a partir da concentração de proteína A de $7,5 \text{ mg mL}^{-1}$, ocorreu um pico catódico mais resoluto e de maior amplitude de corrente elétrica.

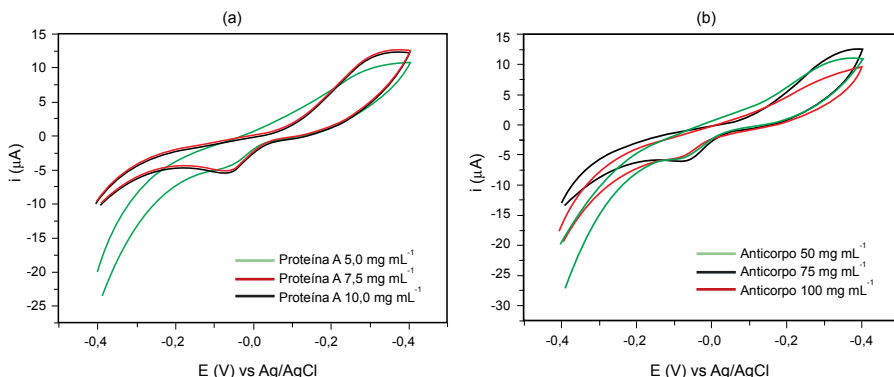


Figura 2. Voltamogramas cíclicos para leituras do imunossensor variando concentrações: a) Proteína A $5,0 \text{ mg mL}^{-1}$; $7,5 \text{ mg mL}^{-1}$ e 10 mg mL^{-1} ; b) Anticorpo primário 50 mg mL^{-1} ; 75 mg mL^{-1} e 100 mg mL^{-1} . Leituras realizadas em tampão PBS (pH 7,4) em presença de hidroquinona (4 mM) e H_2O_2 (600 mM), faixa de potencial de -0,4 V a 0,4 V a $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

Durante a reação catalítica, o mediador hidroquinona reage com a enzima HRP utilizada como marcadora do anticorpo secundário (a qual é oxidada durante a catálise da degradação do peróxido de hidrogênio) e doa os elétrons necessários para o restabelecimento do estado inicial do anel porfirínico da HRP. Quanto maior a intensidade da corrente com melhor definição do pico catódico, maior a transferência eletrônica entre essas moléculas. Dessa forma, espera-se que, nessas

concentrações, a resposta analítica do imunossensor seja intensificada. A mesma avaliação foi conduzida para determinação da concentração de anticorpos e foi observado melhor desempenho na concentração de 75 mg mL^{-1} (Figura 2b). Com base nesses resultados, as concentrações de proteína A e anticorpo foram padronizadas para $7,5 \text{ mg mL}^{-1}$ e 75 mg mL^{-1} , respectivamente, no intuito de dar continuidade ao desenvolvimento do imunossensor.

Otimização das concentrações de Hidroquinona e H_2O_2

Respostas em diferentes concentrações de H_2O_2 (0,2 mM a 500 mM) e HQ (0,04 mM a 6 mM) estão apresentadas no gráfico de superfície de resposta (Figura 3). Os resultados demonstraram uma região ótima para a resposta analítica, localizada na faixa entre as concentrações de 200 mM a 450 mM para o H_2O_2 e acima de 2,5 mM para a HQ. Foram selecionadas as concentrações de 300 mM para H_2O_2 e 3 mM para HQ, a fim de otimizar a resposta analítica e assegurar a integridade das biomoléculas que formam o sistema.

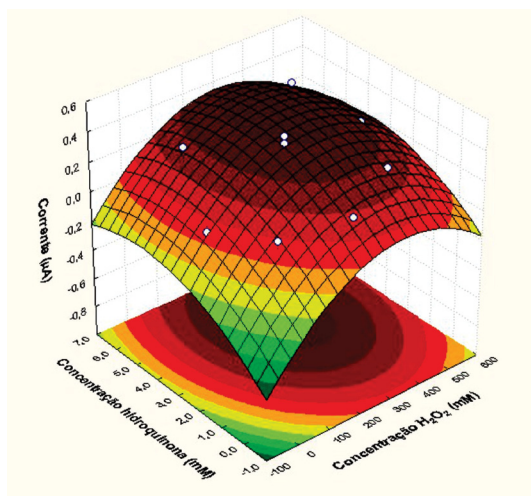


Figura 3. Superfície de resposta do desempenho do imunossensor por cronamperometria em diferentes concentrações de HQ e H_2O_2 .

A intensidade do sinal analítico, proveniente das reações de oxidação-redução, depende das concentrações de H_2O_2 e HQ na célula eletroquímica. Altas concentrações de peróxido de hidrogênio podem

inativar a enzima HRP, ocorrendo queda na corrente do pico catódico e interferindo na resposta analítica do dispositivo. A influência da concentração do mediador hidroquinona na resposta do biossensor foi observada por Silva (2010), que evidenciou o aumento de corrente catódica com o aumento da concentração de hidroquinona. Em baixas concentrações de hidroquinona, a resposta do biossensor depende da concentração do mediador. Somente quando a concentração de hidroquinona é otimizada, a resposta do biossensor se torna dependente da concentração do substrato (MENDES, 2006).

Curva de resposta do imunossensor

A curva de resposta amperométrica do imunossensor na presença de diferentes concentrações de *Salmonella* Typhimurium em tampão PBS está apresentada na Figura 4. A quantidade de bactérias foi confirmada para todas as concentrações, e os resultados das contagens demonstraram uma padronização eficiente do método de preparação da cultura. O procedimento permitiu a preparação de uma cultura bacteriana com 10^8 UFC mL⁻¹ a partir da qual procederam-se diluições seriadas para obtenção das concentrações menores.

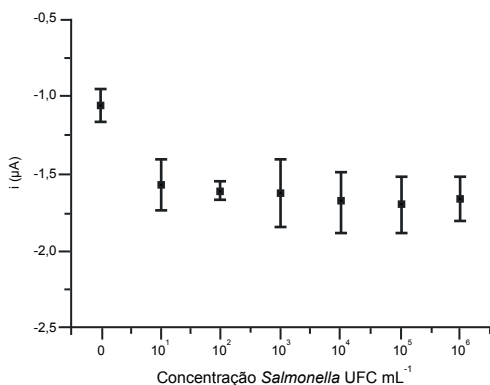


Figura 4. Curva de resposta amperométrica do imunossensor em diferentes concentrações de *Salmonella* Typhimurium (0 UFC mL⁻¹ a 10⁶ UFC mL⁻¹). Resposta analítica em tampão PBS 10 mM (pH 7,4) com H₂O₂ 300 mM e hidroquinona 3 mM potencial de 75 mV por 120 s.

O imunossensor apresentou um limite de detecção (LD) de 10 UFC mL⁻¹, demonstrando-se mais eficiente que a maioria dos métodos rápidos comercialmente disponíveis para detecção de *Salmonella*. Métodos

baseados em ensaios imunoenzimáticos (Elisa) e em reação em cadeia da polimerase (PCR) apresentam LD em torno de 10^4 UFC mL⁻¹ a 10^5 UFC mL⁻¹ e necessitam de etapa de pré-enriquecimento da amostra (LEE et al., 2015).

A resposta analítica do imunossensor foi obtida após separação das células por centrifugação e suspensão em tampão PBS, conforme detalhado na metodologia. Esse procedimento, provavelmente, removeu possíveis interferentes presentes no meio onde as bactérias foram cultivadas e, conseqüentemente, facilitou o reconhecimento do antígeno pelo imunossensor, permitindo alcançar um nível de sensibilidade maior que os demais métodos.

A reprodutibilidade foi calculada com base na Equação 1 e apresentou um valor de 8,2%. Esse é um parâmetro que indica o grau de precisão do método desenvolvido e está diretamente relacionado com a metodologia de montagem e funcionamento.

$$\text{DPR} = (\text{desvio padrão} / \text{média}) \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

Pimenta-Martins et al. (2012), utilizando um protocolo semelhante, desenvolveu um imunossensor amperométrico para a detecção de enterotoxina de *Staphylococcus aureus* com um DPR de 8,3%. Outro aspecto importante no desempenho do imunossensor desenvolvido foi a rapidez na obtenção da resposta de detecção. O tempo de análise do dispositivo foi de 125 min, bastante rápido quando comparado à maioria dos métodos rápidos, bem como a todos os métodos convencionais disponíveis no mercado. Respostas rápidas são de extrema importância para reduzir a incidência de contaminações por *Salmonella*. Além disso, o método aplicado para a obtenção da resposta analítica necessitou de uma estrutura simples, com uma quantidade reduzida de reagentes e facilidade de manipulação. Outro aspecto importante é a possibilidade de miniaturização e portabilidade do sistema, permitindo a realização da análise em qualquer ponto de uma cadeia produtiva.

Observou-se um perfil qualitativo na resposta do imunossensor frente às diferentes concentrações de *Salmonella* Typhimurium testadas. Os resultados foram avaliados estatisticamente ($p \leq 0,05$) e apresentaram diferenças significativas entre o controle (tampão com ausência de *Salmonella*) e as concentrações de *Salmonella* testadas (10^1 UFC mL⁻¹ a 10^6 UFC mL⁻¹). A resposta do imunossensor desenvolvido é bastante interessante, visto que a exigência dos principais órgãos regulamentadores, como Food and Drug Administration (FDA), European Food Safety Authority (EFSA) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), é de ausência da bactéria em alimentos, não sendo necessária sua quantificação.

Quando comparado a outros estudos de desenvolvimento de imunossensores amperométricos para detecção de *Salmonella* (OH et al., 2004a; OH et al., 2004b; BAE et al., 2005; MANTZILA et al. 2008), o resultado obtido no presente trabalho demonstrou-se mais eficiente, pois apresentou um dos menores LDs entre os imunossensores reportados na literatura. Esse resultado indica a eficiência dos procedimentos de montagem, otimização e obtenção da resposta analítica adotados neste estudo, cujos resultados foram apresentados na etapa de desenvolvimento do imunossensor.

Conclusão

O método de montagem e funcionamento do imunossensor desenvolvido é eficiente, produzindo um dispositivo capaz de detectar bactérias do gênero *Salmonella* com rápida resposta analítica e baixo limite de detecção. O dispositivo apresenta potencialidades para miniaturização e aplicação no monitoramento desse patógeno no processo produtivo de alimentos.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao suporte financeiro do CNPq (Processo nº 475174/2012-7) e da Embrapa (03.13.00.050.00.00) e à Capes pela bolsa de mestrado da aluna Afís Maria Araújo Melo.

Referências

ANDREWS, W. H.; JACOBSON, A.; HAMMACK, T. S. *Salmonella*. In: FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Bacteriological Analytical Manual (BAM)**. 2014. Cap. 5. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070149.htm>>. Acesso em: 11 mar. 2015.

ARORA, P.; SINDHU A.; KAUR H.; DILBAGHI, N.; CHAUDHURY A. An overview of transducers as platform for the rapid detection of foodborne pathogens. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 5, p. 1829, 2013.

AVRAMEAS, S. Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. Use of the conjugates for the detection of antigens and antibodies. **Immunochemistry**, v. 6, n. 1, p. 43-49, 1969.

BABACAN, S; PIVARNIK, P; LETCHER S; RAND A.G. Evaluation of antibody immobilization methods for piezoelectric biosensor application. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 15, n. 11/12, p. 615-621, 2000.

BAE, Y.; PARK, K.; OH, B; LEE, W; CHOI, J. W. Immunosensor for detection of *Salmonella* Typhimurium based on imaging ellipsometry. **Colloids And Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 257-258, p. 19-23, 2005.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248, 1976.

ANVISA. Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 10 jan. 2001, Seção 2. Disponível em: <<http://www.anrbrasil.org.br/>>

new/pdfs/2014/3_PAINEL_1_ApresentacaoRejaneAlvesVigilanciaEpidemiologica-VE-DTA-Agosto_2014_PDF.pdf> . Acesso em: 11 mar. 2015.

ANVISA. **Dados epidemiológicos:** DTA período de 2000 a 2014. 2014 Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dados_dta_periodo_2000_2014_site.pdf> . Acesso em: 11 mar. 2015. http://www.anrbrasil.org.br/new/pdfs/2014/3_PAINEL_1_ApresentacaoRejaneAlvesVigilanciaEpidemiologica-VE-DTA-Agosto_2014_PDF.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). U.S. Department of Health and Human Service. Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks — United States, 1998–2008. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, 2013; vol 62. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/mmwr/pdf/ss/ss6202.pdf>> . Acesso em: 15 out. 2013. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/9cbab600417aa4088799e722d1e56fc9/anexos_res0012_02_01_2001.pdf?MOD=AJPERES> . Acesso em: 10 out. 2013.

FURTADO, R. F.; DUTRA, R. A. F.; ALVES, C. R.; PIMENTA, M. G. R.; GUEDES, M. I. **F. Aplicações de biossensores na análise da qualidade de alimentos**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2008. 21 p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Documentos, 117).

GREEN, A. A.; HUGHS, W. L. **Methods in enzymology**. New York: Academic Press, 1955. v. 1, p. 67.

LEE, K.-M.; RUNYON M.; HERRMAN T. J.; HSIEH J.; PHILLIPS R. Review of *Salmonella* detection and identification methods: Aspects of rapid emergency response and food safety. **Food Control**, v. 47, p. 264-276, 2015.

MAKARAVICIUTE, A.; RAMANAVICIENE, A. Site-directed antibody immobilization techniques for immunosensors. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 50, p. 460-471, 2013.

MANTZILA, A. G.; MAIPA, V.; PRODROMIDIS, M. I. Development of a faradic impedimetric immunosensor for the detection of *Salmonella* Typhimurium in milk. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 4, p. 1169, 2008.

MENDES, R. K. **Investigação dos efeitos dos procedimentos de imobilização em monocamadas auto-organizadas da enzima peroxidase no desenvolvimento de um biossensor**. 2006. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

OH, B.; KIM, Y.; PARK, K.; LEE, W.; CHOI, J.W. Surface plasmon resonance immunosensor for the detection of *Salmonella* Typhimurium. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 19, n. 11, p. 1497-1504, 2004a.

OH, B.; LEE, W.; LEE, W. H.; CHOI, J.; KIM, Y. Surface plasmon resonance immunosensor using self-assembled protein G for the detection of *Salmonella* paratyphi.

Journal of Biotechnology, v. 111, n. 1, p. 1-8, 2004b.

PIMENTA-MARTINS, M. G. R.; FURTADO, R. F.; HENEINE, L. G. D.; DIAS, R. S. BORGES, M. D.; ALVES, C. R. Development of an amperometric immunosensor for detection of staphylococcal enterotoxin type A in cheese. **Journal of Microbiological Methods**, v. 91, n. 1, p. 138-143, 2012.

ROSATTO, S. S.; FREIRE, R. S.; DURÁN, N.; KUBOTA, L. T. Amperometric biosensors for phenolic compounds determination in the environmental interest samples. **Química Nova**, v. 24, p. 7786, 2001.

SILVA, V. P. A. **Desenvolvimento de biossensor amperométrico para determinação de peróxido de hidrogênio em leite**. 2010. Monografia (Graduação em Química) – Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2010.

VELUSAMY, V.; ARSHAK, K.; KOROSTYNSKA, O.; OLIWA, K.; ADLEY, C. An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective biosensors. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 232-254, 2010.



Agroindústria Tropical

Ministério da
**Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**

GOVERNO FEDERAL
BRASIL
PÁTRIA EDUCADORA